



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 46 870 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 100 46 870.5
㉑ Anmeldetag: 20. 9. 2000
㉒ Offenlegungstag: 28. 3. 2002

㉓ Int. Cl.⁷:
C 12 N 1/21
C 12 N 15/63
C 12 N 15/54
// (C12N 1/21, C12R
1:15)

DE 100 46 870 A 1

㉔ Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

㉕ Erfinder:
Pompejus, Markus, Dr., 67251 Freinsheim, DE;
Schröder, Hartwig, Dr., 69226 Nußloch, DE; Kröger,
Burkhard, Dr., 67117 Limburgerhof, DE; Zelder,
Oskar, Dr., 67346 Speyer, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉖ Verfahren zur Veränderung des Genoms von Corynebakterien

㉗ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Corynebakterien, enthaltend eine oder mehrere geänderte genomische Sequenzen, wobei ein in Corynebakterien nicht replizierender Vektor verwendet wird, dessen Nukleinsäure von Corynebakterien nicht als fremd erkannt wird.

DE 100 46 870 A 1

Beschreibung

- [0001] Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Veränderung des Genoms von Corynebakterien, Verwendung dieser Bakterien und neue Vektoren. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Veränderung von Corynebakterien mit Hilfe von in Corynebakterien nicht replizierbaren Vektoren.
- [0002] *Corynebacterium glutamicum* ist ein gram-positives, aerobes Bakterium, das (wie auch andere Corynebakterien, d. h. *Corynebacterium* und *Brevibacterium*-Arten) in der Industrie für die Produktion einer Reihe von Feinchemikalien, und auch zum Abbau von Kohlenwasserstoffen und zur Oxidation von Terpenoiden verwendet wird (Zur Übersicht siehe z. B. Liebl (1992) "The Genus *Corynebacterium*", in: *The Prokaryotes*, Volume II, Balows, A. et al., eds. Springer).
- [0003] Aufgrund der Verfügbarkeit von Klonierungsvektoren zur Verwendung in Corynebakterien und Techniken zur genetischen Manipulation von *C. glutamicum* und verwandten *Corynebacterium* und *Brevibacterium*-Arten (siehe z. B. Yoshihama et al., *J. Bacteriol.* 162 (1985) 591-597; Katsumata et al., *J. Bacteriol.* 159 (1984) 306-311; und Santamaria et al. *J. Gen. Microbiol.* 130 (1984) 2237-2246) ist es möglich, diese Organismen genetisch zu verändern (bspw. durch Überexpression von Genen) um sie bspw. als Produzenten von einer oder mehreren Feinchemikalien besser und effizienter zu machen.
- [0004] Die Verwendung von Plasmiden, die in Corynebakterien replizieren können ist dabei eine gut etablierte Technik, die dem Fachmann bekannt ist, breit angewendet wird und mehrfach in der Literatur dokumentiert ist (siehe z. B. Deb, J. K. et al. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 11-20).
- [0005] Es ist ebenfalls möglich, Corynebakterien dadurch genetisch zu verändern, dass die DNA-Sequenz des Genoms modifiziert wird. Es können DNA-Sequenzen in das Genom eingebracht werden (neu eingebracht und/oder vorhandene Sequenzen in weiteren Kopien eingebracht werden), es können auch DNA-Sequenzabschnitte aus dem Genom entfernt werden (z. B. Gene oder Teile von Genen), es können aber auch Sequenzaustausche (z. B. Basenaustausche) im Genom durchgeführt werden.
- [0006] Die Veränderung des Genoms kann dadurch erreicht werden, dass DNA in die Zelle eingebracht wird, die vorzugsweise nicht in der Zelle repliziert und dass diese eingebrachte DNA mit genomischer Wirts-DNA rekombiniert und so die genomische DNA verändert. Die hierfür bekannten Methoden sind aber aufwendig und alle mit speziellen Problemen versehen (siehe z. B. van der Rest, M.E. et al. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 541-545).
- [0007] Ein bekanntes Verfahren basiert auf Konjugation (Schwarzer & Pühler (1991) *Biotechnology* 9, 84-87). Der Nachteil ist, dass spezielle mobilisierbare Plasmide verwendet werden müssen, die konjugativ von einem Donor-Stamm (in der Regel *E. coli*) zum Empfänger (bspw. *Corynebacterium* Arten) übertragen werden müssen. Diese Methode ist zudem sehr arbeitsaufwendig.
- [0008] Die Nachteile der Konjugation sind der Grund, dass es auch zur Veränderung genomischer Sequenzen (und nicht nur zum Einbringen von frei replizierenden Plasmiden) vorteilhaft ist, statt der Konjugation die etablierte einfache Methode der Elektroporation (Liebl et al. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 65, 299-304) durchzuführen. Es wurde eine neue Methode beschrieben, die dies zwar ermöglicht (van der Rest, M.E. et al. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 541-545), dafür aber andere Probleme hat. Die zu transformierenden Zellen werden bei sub-optimalen tiefen Temperaturen kultiviert, dem Wachstumsmedium werden spezielle wachstumsbeeinträchtigende Mediumszusätze zugegeben und die Zellen werden mit einem Hitzeschock behandelt.
- [0009] Alle Methoden des DNA-Transfers in Corynebakterien haben als Problem das Wirts-eigene Restriktionssystem von Corynebakterien, das als fremd erkannte DNA abbaut. Es gibt zahlreiche Ansätze in der Literatur, dieses Restriktionssystem zu umgehen, die aber alle spezifische Probleme haben.
- [0010] Es gibt Versuche, DNA aus *E. coli* Stämmen einzusetzen, die Mutationen in den *dam* und *dcm* Genen tragen (Ankri et al. (1996) *Plasmid* 35, 62-66). Dies führt zu DNA, die keine *Dam* und *Dcm* Methylierung mehr trägt, aber weiterhin die *E. coli*-spezifische *hsd* Methylierung besitzt. Diese DNA wird weiterhin von *Corynebacterium* als Fremd-DNA erkannt.
- [0011] Eine Möglichkeit, Probleme mit dem Restriktionssystem zu umgehen ist es, Restriktionsdefiziente Mutanten zu isolieren (Liebl et al. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 65, 299-304). Der Nachteil ist aber, dass man aber auf solche speziellen Mutanten-Stämme beschränkt ist.
- [0012] Ein anderer Weg ist die temporäre Ausschaltung des Restriktionssystems z. B. durch Hitzeschock. Sowohl bei Konjugation (Schwarzer & Pühler (1991) *Biotechnology* 9, 84-87) als auch bei Elektroporation (van der Rest, M.E. et al. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 541-545) kann damit ein gewünschter Effekt erzielt werden. Nachteile sind die aufwendige Durchführung und der Effekt, dass durch den Hitzeschock nicht nur das Restriktionssystem sondern auch zahlreiche andere Zell-Prozesse beeinflusst werden. Generell hat die Hitzeschockantwort bei Bakterien als Reaktion auf den Hitzeschock eine Vielzahl von Konsequenzen für den Stoffwechsel der Zellen (siehe z. B. Gross, C.A. (1996), pp. 1382-1399 in *Escherichia coli* and *Salmonella* (Neidhart et al., eds.) ASM press, Washington).
- [0013] Unter Corynebakterien im Sinne der Erfindung werden *Corynebacterium*-Arten, *Brevibacterium*-Arten und *Mycobacterium*-Arten verstanden. Bevorzugt sind *Corynebacterium*-Arten und *Brevibacterium*-Arten. Beispiele für *Corynebacterium*-Arten und *Brevibacterium*-Arten sind: *Brevibacterium brevis*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium lactofermentum*. Beispiele für *Mycobacterium*-Arten sind: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium* *h*-vis.
- [0014] Insbesondere sind folgende in der Tabelle angegebenen Stämme bevorzugt:

DE 100 46 870 A 1

Tabelle

Corynebacterium und Brevibacterium Stämme

Genus	Species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	
Brevibacterium	Ammoniagenes	21034					5
Brevibacterium	Ammoniagenes	19350					
Brevibacterium	Ammoniagenes	19351					
Brevibacterium	Ammoniagenes	19352					10
Brevibacterium	Ammoniagenes	19353					
Brevibacterium	Ammoniagenes	19354					
Brevibacterium	Ammoniagenes	19355					
Brevibacterium	Ammoniagenes	19356					15
Brevibacterium	Ammoniagenes	21055					
Brevibacterium	Ammoniagenes	21077					
Brevibacterium	Ammoniagenes	21553					
Brevibacterium	ammoniagenes	21580					
Brevibacterium	ammoniagenes	39101					20
Brevibacterium	butanicum	21196					
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928				
Brevibacterium	flavum	21474					
Brevibacterium	flavum	21129					25
Brevibacterium	flavum	21518					
Brevibacterium	flavum			B11474			
Brevibacterium	flavum			B11472			30

	Genus	Species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	
	Brevibacterium	flavum	21127					
5	Brevibacterium	flavum	21128					
	Brevibacterium	flavum	21427					
	Brevibacterium	flavum	21475					
	Brevibacterium	flavum	21517					
10	Brevibacterium	flavum	21528					
	Brevibacterium	flavum	21529					
	Brevibacterium	flavum			B11477			
	Brevibacterium	flavum			B11478			
	Brevibacterium	flavum	21127					
15	Brevibacterium	flavum			B11474			
	Brevibacterium	heali	15527					
	Brevibacterium	ketoglutamicum	21004					
	Brevibacterium	ketoglutamicum	21089					
20	Brevibacterium	ketosoreductum	21914					
	Brevibacterium	lactofermentum				70		
	Brevibacterium	lactofermentum				74		
	Brevibacterium	lactofermentum				77		
25	Brevibacterium	lactofermentum	21798					
	Brevibacterium	lactofermentum	21799					
	Brevibacterium	lactofermentum	21800					
	Brevibacterium	lactofermentum	21801					
30	Brevibacterium	lactofermentum			B11470			
	Brevibacterium	lactofermentum			B11471			
	Brevibacterium	lactofermentum	21086					
	Brevibacterium	lactofermentum	21420					
	Brevibacterium	lactofermentum	21086					
35	Brevibacterium	lactofermentum	31269					
	Brevibacterium	linens	9174					
	Brevibacterium	linens	19391					
	Brevibacterium	linens	8377					
40	Brevibacterium	paraffinolyticum					11160	
	Brevibacterium	spec.						CBS 717.73
	Brevibacterium	spec.						CBS 717.73
	Brevibacterium	spec.	14604					
45	Brevibacterium	spec.	21860					
	Brevibacterium	spec.	21864					
	Brevibacterium	spec.	21865					
	Brevibacterium	spec.	21866					
50	Brevibacterium	spec.	19240					
	Corynebacterium	acetoacidophilum	21476					
	Corynebacterium	acetoacidophilum	13870					
	Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473			
	Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475			
55	Corynebacterium	acetoglutamicum	15806					
	Corynebacterium	acetoglutamicum	21491					
	Corynebacterium	acetoglutamicum	31270					
	Corynebacterium	acetophilum			B3671			
60	Corynebacterium	ammoniaenes	6872					NCTC 2399
	Corynebacterium	ammoniaenes	15511					
	Corynebacterium	fujikense	21496					
	Corynebacterium	glutamicum	14067					
65	Corynebacterium	glutamicum	39137					
	Corynebacterium	glutamicum	21254					
	Corynebacterium	glutamicum	21255					

DE 100 46 870 A 1

Genus	Species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	
Corynebacterium	glutamicum	31830					
Corynebacterium	glutamicum	13032					
Corynebacterium	glutamicum	14305					5
Corynebacterium	glutamicum	15455					
Corynebacterium	glutamicum	13058					
Corynebacterium	glutamicum	13059					
Corynebacterium	glutamicum	13060					10
Corynebacterium	glutamicum	21492					
Corynebacterium	glutamicum	21513					
Corynebacterium	glutamicum	21526					
Corynebacterium	glutamicum	21543					15
Corynebacterium	glutamicum	13287					
Corynebacterium	glutamicum	21851					
Corynebacterium	glutamicum	21253					
Corynebacterium	glutamicum	21514					20
Corynebacterium	glutamicum	21516					
Corynebacterium	glutamicum	21299					
Corynebacterium	glutamicum	21300					
Corynebacterium	glutamicum	39684					25
Corynebacterium	glutamicum	21488					
Corynebacterium	glutamicum	21649					
Corynebacterium	glutamicum	21650					
Corynebacterium	glutamicum	19223					30
Corynebacterium	glutamicum	13869					
Corynebacterium	glutamicum	21157					
Corynebacterium	glutamicum	21158					
Corynebacterium	glutamicum	21159					
Corynebacterium	glutamicum	21355					35
Corynebacterium	glutamicum	31808					
Corynebacterium	glutamicum	21674					
Corynebacterium	glutamicum	21562					
Corynebacterium	glutamicum	21563					40
Corynebacterium	glutamicum	21564					
Corynebacterium	glutamicum	21565					
Corynebacterium	glutamicum	21566					
Corynebacterium	glutamicum	21567					45
Corynebacterium	glutamicum	21568					
Corynebacterium	glutamicum	21569					
Corynebacterium	glutamicum	21570					
Corynebacterium	glutamicum	21571					50
Corynebacterium	glutamicum	21572					
Corynebacterium	glutamicum	21573					
Corynebacterium	glutamicum	21579					
Corynebacterium	glutamicum	19049					
Corynebacterium	glutamicum	19050					55
Corynebacterium	glutamicum	19051					
Corynebacterium	glutamicum	19052					
Corynebacterium	glutamicum	19053					
Corynebacterium	glutamicum	19054					60
Corynebacterium	glutamicum	19055					
Corynebacterium	glutamicum	19056					
Corynebacterium	glutamicum	19057					
Corynebacterium	glutamicum	19058					65
Corynebacterium	glutamicum	19059					
Corynebacterium	glutamicum	19060					

[0020] Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass die eingebrachte DNA nicht als Fremd-DNA erkannt wird und sie durch das Restriktionssystem deshalb nicht abgebaut wird.

[0021] Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß keine Konjugation durchgeführt werden muß – das vermindert den Arbeitsaufwand beträchtlich und ermöglicht verbesserte Flexibilität bei der Wahl der eingesetzten Plasmide.

[0022] Ein weiterer Vorteil ist, dass keine speziellen Corynebakterien-Stämme eingesetzt werden müssen und dass keine spezielle Behandlung der zu transformierenden Stämme notwendig ist, insbesondere ist kein Hitzeschock notwendig. Für experimentelle Details siehe Beispiel.

[0023] Die so erzeugten Mutanten können dann zur Herstellung von Feinchemikalien verwendet werden oder im Falle von *C. diphtheriae* für die Herstellung z. B. von Impfstoffen mit abgeschwächten oder nicht-pathogenen Erregern. Unter Feinchemikalien werden verstanden: organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren sowie Enzyme.

[0024] Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Moleküle, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts- und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimalinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuminaka, A. (1996) *Nucleotides and related compounds*, S. 561–612, in *Biotechnology* Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH; Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diöle (bspw. Propandiol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443–613 (1996) VCH; Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" *Proceedings of the UNFSCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research – Asien*, abgehalten am 1. bis 3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCs Press (1995)), Enzyme Polyketide (Cane et al. (1998) *Science* 282: 63–68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

A. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen

[0025] Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt, dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57–97 VCH; Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthes- und Abbauewege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. *Biochemistry*, 3. Auflage, S. 578–590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthesen mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

[0026] Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Tysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weiterhin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) *Amino acids – technical production and use*, S. 466–502 in Rehm et al., (Hrsg.) *Biotechnology* Bd. 6, Kapitel 14a, VCH; Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57–97, VCH; Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

[0027] Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533–606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf

[0020] Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass die eingebrachte DNA nicht als Fremd-DNA erkannt wird und sie durch das Restriktionssystem deshalb nicht abgebaut wird.

[0021] Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß keine Konjugation durchgeführt werden muß – das vermindert den Arbeitsaufwand beträchtlich und ermöglicht verbesserte Flexibilität bei der Wahl der eingesetzten Plasmide.

[0022] Ein weiterer Vorteil ist, dass keine speziellen Corynebakterien-Stämme eingesetzt werden müssen und dass keine spezielle Behandlung der zu transformierenden Stämme notwendig ist, insbesondere ist kein Hitzeschock notwendig. Für experimentelle Details siehe Beispiel.

[0023] Die so erzeugten Mutanten können dann zur Herstellung von Feinchemikalien verwendet werden oder im Falle von *C. diphtheriae* für die Herstellung z. B. von Impfstoffen mit abgeschwächten oder nicht-pathogenen Erregern. Unter Feinchemikalien werden verstanden: organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren sowie Enzyme.

[0024] Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Moleküle, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts- und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimlinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) *Nucleotides and related compounds*, S. 561–612, in *Biotechnology* Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH; Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diöle (bspw. Propandiol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443–613 (1996) VCH; Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" *Proceedings of the UNFSCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research – Asien*, abgehalten am 1. bis 3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCs Press (1995)), Enzyme Polyketide (Cane et al. (1998) *Science* 282: 63–68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

A. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen

[0025] Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt, dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57–97 VCH; Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthes- und Abbaupfade von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. *Biochemistry*, 3. Auflage, S. 578–590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthesen mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

[0026] Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weiterhin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) *Amino acids – technical production and use*, S. 466–502 in Rehm et al., (Hrsg.) *Biotechnology* Bd. 6, Kapitel 14a, VCH; Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57–97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

[0027] Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533–606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf

chend komplex, daß sie noch nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der beteiligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamadenin dinukleotid) und NADP (Nikotinamadenin dinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

[0034] Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

C. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

[0035] Gens für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

[0036] Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d. h. AMP) oder als Coenzyme (d. h. FAD und NAD) dienen.

[0037] Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", *Med. Res. Reviews* 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressivum oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 (1995) 752-757; *Biochem. Soc. Transact.* 23 (1995) 877-902). Die Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z. B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology" Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

[0038] Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, Bd. 42, Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; Kap. 8 in: *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (ANP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Finschritt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukleotides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

D. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

[0039] Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über α , α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610; Singer, M.A. und Lindquist, S. *Trends Biotech.* 16 (1998) 460-467; Paiva, C.I.A. und Panek, A.D. *Biotech Ann. Rev.* 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M.J. *Japan J.* 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

[0040] Dieses Vorgehen kann in analoger Weise auch mit anderen Bakterien durchgeführt werden.

Beispiel

[0041] Man kann einen beliebigen Sequenzabschnitt des *ddh*-Gens von *C. glutamicum* (Ishino et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 3917), insbesondere ein Fragment im 5'-terminalen Bereich der kodierenden Region mit bekannten Me-

thoden per PCR amplifizieren und das resultierende PCR-Produkt in pSL18 (Kim, Y.H. & H.-S. Lee (1996) J. Microbiol. Biotechnol. 6, 315–320) klonieren und so den Vektor pSL18Δddh erhalten. Man kann dafür auch andere Vektoren mit einem für *C. glutamicum* geeigneten Markergen verwenden. Die Vorgehensweise ist dem Fachmann geläufig.

- [0042] Man kann das cglIM-Gen in einem geeigneten *E. coli* Stamm (McrBC-defizient (alternative Bezeichnung hsdR^M defizient) wie z. B. NM522 oder HB101) auf unterschiedliche Weise exprimieren, sowohl als genomische Kopie als auch auf Plasmiden. Eine Methode beruht auf der Verwendung des Plasmides pTc15AcgIIIM. Das Plasmid pTc15AcgIIIM umfasst den Replikationsursprung des Plasmides p15A (Selzer et al. (1983) Cell 32, 119–129), ein Gen für Resistenz gegen Tetracyclin (Genbank Acc. No. J01749) und das cglIM-Gen (Schäfer et al. (1997) Gene 203, 93–101). *E. coli* Stämme, die pTc15AcgIIIM tragen, haben DNA die das cglIM Methylierungsmuster trägt. Entsprechend sind die pSL18-Derivate (wie pSL18Δddh, siehe oben) ebenfalls "cglIM-methyliert".
- [0043] Man kann die Plasmid-DNA des Stammes NM522(pTc15AcgIIIM/pSL18Δddh) nach üblichen Methoden (Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons) präparieren und diese DNA zur Elektroporation von *C. glutamicum* (Liebl et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 65, 299–304) einsetzen. Dabei kann *C. glutamicum* ATCC13032 verwendet werden, es können aber auch andere Corynebakterien verwendet werden.
- [0044] Plasmid pSL18Δddh gewonnen aus einem *E. coli* Stamm ohne pTc15AcgIIIM führte bei keinem unserer Versuche zu Transformanten nach Elektroporation. Im Gegensatz dazu, führte pSL18Δddh gewonnen aus einem pTc15AcgIIIM-tragenden *E. coli* Stamm dazu, daß Transformanten durch Elektroporation gewonnen werden konnten. Diese Transformanten waren Klone, bei denen das ddh-Gen deaktiviert wurde, wie bspw. durch fehlende Ddh-Aktivität gezeigt werden konnte. Ddh-Aktivität kann nach bekannten Methoden (siehe z. B. Misono et al. (1986) Agric. Biol. Chem. 50, 1329–1330) gemessen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Corynebakterien enthaltend eine oder mehrere geänderte genomische Sequenzen, wobei ein in Corynebakterien nicht replizierender Vektor verwendet wird, dessen Nukleinsäure von Corynebakterien nicht als fremd erkannt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Vektor das corynebakterielle DNA-Methylierungsmuster trägt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Methylierungsmuster durch eine Methyltransferase erhältlich ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei es sich bei den Corynebakterien um *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium lactofermentum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium brevis* handelt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei es sich bei den veränderten genomischen Sequenzen um eine oder mehrere Punktmutationen, eine oder mehrere Disruptionen, Einbringen eines oder mehrerer im Organismus vorhandener oder fremder Gene, handelt.
6. Verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien, wobei ein nach einem der in den Ansprüchen 1 bis 5 beanspruchten Verfahren hergestellter Mikroorganismus zur Produktion der Feinchemikalie verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Feinchemikalie eine natürlich vorkommende Aminosäure, insbesondere Lysin, Threonin, Glutamat oder Methionin ist, oder ein Vitamin, insbesondere Riboflavin oder Pantothenensäure ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, wobei das Methylierungsmuster durch die Methyltransferase cglIM erhältlich ist.
9. Nicht in Corynebakterien replizierender Vektor mit einem Corynebakterien-spezifischen Methylierungsmuster.
10. Vektor nach Anspruch 9 mit einem Methylierungsmuster erhältlich durch eine Methyltransferase, insbesondere cglIM.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.